

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskripsif. Penelitian deskriptif dilakukan terhadap sekumpulan objek yang biasanya bertujuan untuk melihat gambaran fenomena yang terjadi di dalam populasi tertentu (Notoatmodjo, 2012). Penelitian ini bertujuan menggambarkan Angka Lempeng Total dan mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* pada susu kedelai di Denpasar Selatan dengan media *Chromocult* Agar.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

- a. Lokasi untuk pengambilan sampel dilakukan di Denpasar Selatan.
- b. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Analis Kesehatan dan Laboratorium Kesehatan Lingkungan RSUP Sanglah.

2. Waktu penelitian

Waktu pengambilan sampel dan pemeriksaan laboratorium untuk penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Juni 2018.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi penelitian adalah sekelompok subjek yang menjadi objek atau sasaran peneliti (Notoatmodjo, 2012). Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh susu kedelai yang dijual oleh pedagang susu kedelai di Kecamatan Denpasar Selatan.

2. Sampel peneliti

a. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah susu kedelai yang diperoleh dari pedagang susu kedelai di Kecamatan Denpasar Selatan.

b. Besar sampel

Sampel penelitian adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Sugiyono, 2014). Sejumlah 60 pedagang susu kedelai yang berjualan susu kedelai di Kecamatan Denpasar Selatan, jumlah pedagang yang akan digunakan susu kedelainya sebagai sampel adalah 13 pedagang. Jumlah susu kedelai yang diambil sebagai sampel pada masing-masing pedagang adalah dua buah yakni susu kedelai dalam kemasan plastik dan botol, sehingga jumlah sampel sebanyak 26 susu kedelai.

c. Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah teknik *cluster sampling*, yakni didasarkan pada suatu kelompok atau gugus yang terdiri dari unit geografis (Notoatmodjo, 2012). Pedagang susu kedelai yang tersebar di Kecamatan Denpasar Selatan yang memiliki 10 wilayah dengan jumlah masing-masing pedagang susu kedelai yang bervariasi, sehingga untuk dapat mencerminkan hasil populasi, ditentukan jumlah sampel pada masing-masing desa menggunakan teknik *two stage cluster sampling*. Teknik sampling ini tidak semua unit elementer dalam *primary sampling unit* (psu) digunakan. Akan tetapi, ditarik lagi sampel dari tiap-tiap psu dengan *sampling fraction* yang berimbang dengan jumlah anggota atau unit elementer dalam tiap psu. Sampling tahap pertama, yaitu memilih psu dari total psu. Sampling tahap kedua, yaitu memilih

unit elementer dari unit elementer yang ada dalam psu yang terpilih pada sampling tahap pertama (Nazir, 2005).

Tabel 3
Jumlah Pedagang Sampel Susu Kedelai di masing-masing Desa di Kecamatan Denpasar Selatan

No	Desa/ Kelurahan	Total Pedagang Susu Kedelai tiap Desa	<i>Cluster sampling</i> (Jml pedagang × <i>fraction</i> 50%)	Total Pengambilan
1	Desa Pemogan	18	-	-
2	Desa Sanur Kaja	2	-	-
3	Desa Sanur Kauh	3	3×0.5	1
4	Desa Sidakarya	6	6×0.5	3
5	Kelurahan Panjer	10	-	-
6	Kelurahan Pedungan	6	6×0.5	3
7	Kelurahan Renon	7	7×0.5	3
8	Kelurahan Sanur	1	-	-
9	Kelurahan Serangan	0	-	-
10	Kelurahan Seseetan	7	7×0.5	3
Total		60		13

Keterangan :

: Daerah yang digunakan sebagai tempat pengambilan sampel.

Dari data sekunder diperoleh keterangan bahwa terdapat 10 wilayah di Kecamatan Denpasar Selatan. Dengan perkataan lain, $M = 10$. Penelitian tersebut secara *random* memilih psu sebagai sampel dengan menggunakan *fraction* 50%. Jumlah psu pada sampling pertama adalah 5 wilayah. Dengan 5 wilayah yang terpilih adalah Sanur Kauh, Sidakarya, Pedungan, Renon dan Seseetan dengan total pedagang sebanyak 26. Tidak semua pedagang tersebut digunakan sebagai responden, tetapi dari hasil tersebut akan ditarik lagi sampel tahap kedua secara

random dan berimbang dengan *fraction* 50%. Jumlah pedagang susu kedelai yang akan digunakan sebagai responden adalah sebanyak 13 pedagang.

Untuk memilih susu kedelai pada pedagang mana yang akan dijadikan sampel maka digunakan teknik random dengan cara undian agar pengambilan terlepas dari perasaan objektif (Arikunto, 2006). Seluruh sampel penelitian harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

- 1) Kriteria inklusi adalah susu kedelai yang dijual dipasaran baik yang mencantumkan merek dagang, nomor registrasi BPOM, tanggal kedaluwarsa dan indikasi penyimpanan produk olahan maupun tidak mencantumkan semua indikasi tersebut, yang dijual dalam kemasan botol dan plastik, serta dijual oleh pedagang permanen di Kecamatan Denpasar Selatan.
- 2) Kriteria esklusi susu kedelai yang dijual dipasaran dengan kemasan rusak dan dijual oleh pedagang tidak permanen di Kecamatan Denpasar Selatan.

D. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data Primer

Data yang dikumpulkan adalah data primer yang diperoleh secara langsung dari subjek penelitian meliputi data hasil pemeriksaan laboratorium yaitu menguji sampel susu kedelai menggunakan Angka Lempeng Total dengan metode tuang dan mengidentifikasi *E.coli* patogen atau tidak.

b. Data Sekunder

Data yang telah disusun oleh pihak lain digunakan sebagai data pendukung penelitian (Sugiyono, 2014). Data sekunder yang didapat yaitu mengutip peta wilayah Kecamatan Denpasar Selatan.

2. Cara pengumpulan data

Cara pengumpulan data melalui wawancara dan observasi yaitu pengamatan secara langsung terhadap merek susu kedelai yang dijual serta sumber susu kedelai tersebut diproduksi dan melakukan pemeriksaan laboratorium untuk mengetahui angka lempeng total dan mengidentifikasi bakteri *E.coli* patogen atau tidak pada susu kedelai.

c. Wawancara

Melakukan wawancara dimana terlebih dahulu penulis melakukan pendekatan kepada pedagang susu kedelai kemudian menjelaskan maksud dan tujuan penulis sehingga pedagang susu kedelai dapat memahami maksud penelitian dan mengetahui umur, jenis kelamin, pendidikan dan lama berjualan pedagang susu kedelai, serta mengetahui sumber susu kedelai yang dijual.

d. Observasi

Observasi berfungsi untuk melengkapi dengan format atau blanko pengamatan. Format observasi susu kedelai yang disusun berisi tentang kemasan susu kedelai, merek susu kedelai, nomor registrasi BPOM, tanggal kedaluwarsa dan indikasi penyimpanan produk, serta kebersihan lokasi penjualan.

e. Pemeriksaan laboratorium

1. Pengambilan Sampel

Sampel diambil oleh peneliti dengan persetujuan pedagang susu kedelai, kemudian dimasukkan kedalam *coolbox* dan langsung dibawa ke Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan serta langsung dilakukan pemeriksaan pada hari itu juga.

2. Preparasi sampel

Sampel yang digunakan dihomogenkan terlebih dahulu, kemudian di desinfeksi bagian luar kemasan susu kedelai.

3. Pemeriksaan angka lempeng total

Langkah dalam pemeriksaan angka lempeng total pada sampel susu kedelai adalah sebagai berikut:

a) Disiapkan 5 buah tabung reaksi yang telah berisi 9 mL larutan pengencer yaitu NaCl 0,9% dan tandailah kelima tabung sesuai dengan pengenceran seperti berikut: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} dan kontrol serta tanggal pemeriksaan.

b) Disiapkan 5 buah petri dish dan tandai sesuai dengan pengenceran seperti berikut: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} dan kontrol serta tanggal pemeriksaan dibalik petridish.

c) Bahan atau sampel dikocok sampai homogen kemudian dibuka secara aseptis di dekat nyala api spiritus.

d) Dipipet sampel sebanyak 1mL dimasukan kedalam tabung 1 yang telah berisi 9 mL larutan pengencer secara aseptis dekat nyala api spiritus sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} dan campuran dihomogenkan.

e) Kemudian dari hasil pengenceran 10^{-1} tersebut dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung ke-2 yang telah berisi 9 mL larutan pengencer secara aseptis dekat nyala api spiritus sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan campuran dihomogenkan.

f) Pengenceran dilakukan demikian seterusnya hingga diperoleh pengenceran bertingkat 10^{-3} , 10^{-4} .

g) Dari setiap pengenceran dipipet 0,1mL dan dimasukkan kedalam cawan petri yang telah berisi media *plate count agar* padat yang dikerjakan secara aseptis dekat nyala api spiritus.

h) Kemudian segera diratakan sampel dengan metode sebar menggunakan spreader perlahan agar sampel tercampur rata pada media.

i) Kemudian diinkubasi pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam dengan posisi terbalik.

j) Kontrol dibuat dengan cara dimasukkan sebanyak 0,1mL NaCl 0,9% pada media *plate count agar* padat dalam petridish “kontrol”.

4. Pembacaan hasil angka lempeng total

a) Hitung jumlah koloni yang tumbuh pada tiap-tiap petridish.

b) Koloni yang bergabung menjadi satu atau membentuk satu deretan yang terlihat sebagai garis tebal atau jumlah koloni meragukan dihitung sebagai satu koloni kuman.

c) Hitung jumlah koloni yang tumbuh pada petridish berisi kontrol. Apabila jumlah koloni pada petridish kotrol lebih dari 10 maka pemeriksaan harus diulang karena sterilisasi dianggap kurang baik.

Perhitungan hanya dilakukan pada petridish yang menghasilkan jumlah koloni antara 30-300 dan bila jumlah koloni pada petridish kontrol lebih kecil dari 10 maka jumlah koloni pada masing-masing petridish harus terlebih dahulu dikurangi dengan jumlah koloni kontrol.

5. Contoh Perhitungan

Pengenceran	Jumlah Koloni
Kontrol	2 koloni
Pengenceran 10^{-1}	347 koloni
Pengenceran 10^{-2}	162 koloni
Pengenceran 10^{-3}	98 koloni
Pengenceran 10^{-4}	57 koloni
Pengenceran 10^{-5}	22 koloni

Kontrol dari hasil tersebut memenuhi syarat dan hasil yang dapat dihitung adalah pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}

Cara menghitung angka lempeng total:

Angka lempeng total

$$= \frac{((162 - 2) \times 100 + ((98 - 2) \times 1000 + ((57 - 2) \times 10.000))}{3}$$

$$= \frac{16.000 + 96.000 + 550.000}{3}$$

$$= \frac{662.000}{3}$$

$$= 220.667 \text{ koloni tiap gram}$$

6. Pemeriksaan *E.coli* patogen

Langkah dalam pemeriksaan *E.coli* patogen pada sampel susu kedelai adalah sebagai berikut:

- a) Pengenceran yang sudah dilakukan sebelumnya, ditanam pada media *chromocult* agar.
- b) Bahan atau sampel dikocok sampai homogen kemudian dibuka secara aseptis di dekat nyala api spiritus.
- c) Pengenceran yang ditanam pada media *chromocult* adalah pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} .
- d) Dari setiap pengenceran dipipet 0,1 mL dan diteteskan kedalam media *chromocult* agar yang dikerjakan secara aseptis dekat nyala api spiritus.
- e) Kemudian dilakukan inokulasi dengan menggunakan metode sebar yang dikerjakan secara aseptis dekat nyala api spiritus.
- f) Inokulasi diinkubasi pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ selama 24-48 jam dengan posisi terbalik.
- g) Kontrol dibuat dengan cara dimasukkan sebanyak 15-20mL media *chromocult* agar cair dalam petridish “kontrol”.
- k) Diambil koloni berwarna biru yang tumbuh pada media *chromocult* agar.
- l) Dilanjutkan dengan penanaman pada media Brilliant Green Lactose Broth dan diinkubasi pada suhu 44°C selama 24 jam. Selain itu dilakukan uji Anti-sera *E.coli* polivalen 2,3 dan 4, dengan cara sebagai berikut:
 - (1)Diteteskan 1 tetes masing-masing serum Anti-sera *E.coli* polivalen 2,3 dan 4.
 - (2)Diambil koloni yang terbentuk sebanyak 1 ose.
 - (3)Dicampurkan koloni dengan serum apabila terbentuk aglutinasi menunjukkan hasil positif.

2. Instrumen Penelitian

a. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah alat tulis, alat dokumentasi, lembar distribusi frekuensi jawaban responden dan lembar observasi.

b. Pemeriksaan laboratorium yang digunakan adalah:

1. Alat penelitian yang diperlukan antara lain: Erlenmeyer (*Iwaki-Pyrex*®) volume 100 mL (4 buah), gelas ukur (*Iwaki-Pyrex*®) volume 500 mL (2 buah), tabung reaksi (*Iwaki-Pyrex*®) volume 20 mL (50 buah), mikropipet 1000µl (1 buah) dan 100µl (1 buah) (*Biocorex*), *Coolbox* (1 buah), rak tabung (2 buah), *colony counter* (*Stuart*) (1 buah), blue tip (31 buah), yellow tip (30 buah), Spiritus (1 buah), petri dish (200 buah), pinset (1 buah), spidol (1 buah), batang pengaduk (1 buah), d & n ballpipet (2 buah), spatula (2 buah), ose (1 buah), spreader (1 buah), neraca analitik (*RADWAG*) (1 buah), inkubator (*T01892-ESCO*) (1 buah), autoclave (*Tomysx-500*) (1 buah), *Biosafety Cabinet (BIOBASE)* (1 buah), *magnetic stirrer (JISICO)*, aluminium foil, benang gulung, kapas berlemak, label, korek api dan gunting,
2. Media yang digunakan antara lain: Aquadest (*BRATACO*), NaCl (*MERCK*) 0.9%, Media *Plate Count Agar (OXOID)*, Media *Chromocult Coliform Agar (OXOID)*, Media *Brilliant Green Lactose Broth (OXOID)* dan Serum Anti-sera *E.coli* 2,3 dan 4 (polivalen) (*BIO FARMA*).

E. Pengolahan dan Teknik Analisis Data

1. Pegolahan data

Data-data yang dikumpulkan dari hasil pengujian, wawancara dan observasi diolah dengan menggunakan teknik pengolahan data secara *tabulating* data yaitu data yang disajikan dalam tabel dengan diberi narasi.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif yaitu membandingkan kenyataan dilapangan atau hasil pemeriksaan dengan teori serta Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 16 Tahun 2016 tentang kriteria mikrobiologi dalam pangan.